

Aus dem Diabetes-Forschungsinstitut an der
Universität Düsseldorf
- Biochemische Abteilung -
Direktor: Professor Dr. Hans Reinauer

Die Präparation großer Mengen
Plasmamembranen aus Rinderleber
durch Kombination von
Differential- und Isopyknischer Zentrifugation
im Durchfluß

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
der
Medizinischen Fakultät
der
Universität Düsseldorf
vorgelegt
von
Ludger Budde
und
Hermann Gundlach

1980


Aus dem Diabetes - Forschungsinstitut an der
Universität Düsseldorf
- Biochemische Abteilung -
Direktor: Professor Dr. Hans Reinauer

DIE PRÄPARATION GROßER MENGEN PLASMAMEMBRANEN
AUS RINDERLEBER DURCH KOMBINATION VON
DIFFERENTIAL- UND ISOPYKNISCHER ZENTRIFUGATION
IM DURCHFLUß

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Zahnmedizin
der
Medizinischen Fakultät
der
Universität Düsseldorf
vorgelegt
von
Ludger Budde
und
Hermann Gundlach

1980



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. dent.
M. Straßburg

Referent

gez.: Prof. Dr. med.
H. Reinauer

Koreferent

gez.: Prof. Dr. med.
W. Staib

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1. Problemstellung	5
3. Materialien und Methoden	7
3.1. Analytik	7
3.2. Reagentien	8
3.3. Lösungen	8
3.4. Abkürzungen und Symbole	8
4. Flußdiagramm des Verfahrens	10
4.1. Erläuterungen zum Flußdiagramm	11
5. Ergebnisse und Diskussion	16
5.1. Wahl des Organes	16
5.2. Homogenisation	17
5.3. Das Leberhomogenat	18
5.4. Durchflußzentrifugation	20
5.5. Zonalflotation	23
5.6. Erweitertes Präparationsverfahren	23
6. Literaturverzeichnis	31
7. Tabellen	38
8. Abbildungen	41

Herrn Professor Dr. Hans Reinauer danken wir für die Anregung dieser Arbeit sowie für seine Förderung und Unterstützung, die deren Durchführung ermöglichte.

Unser Dank gilt auch Herrn Dr. H.J. Bubenzer für sein stetes Interesse, seine zahlreichen wertvollen Ratschläge und seine ständige Bereitschaft zu hilfreichen Gesprächen.

Allen Mitarbeitern des Institutes danken wir für die technische und praktische Unterstützung.

1. Zusammenfassung:

Plasmamembranen aus Rinderleber werden mittels Durchflußzentrifugationen, an die sich eine Flotation im Zonalrotor anschließt, isoliert. Die erste Durchflußzentrifugation ist eine Differentialsedimentation. In den weiteren Durchflußzentrifugationen ist in dieser Anwendung als technische Novität das Prinzip der Differentialsedimentation mit einer isopyknischen Sedimentation kombiniert.

Die Kapazität der Homogenisation und Durchflußzentrifugation beträgt 1.5 Kilogramm Leber. Wird das Sediment nach der ersten Durchflußzentrifugation flotiert, so ist das Fassungsvermögen des Zonalrotors mit 150 g Leber erschöpft. Nach insgesamt drei vorhergehenden Durchflußzentrifugationen unterschiedlicher Techniken ist es möglich, im gleichen Zonalrotor ein Äquivalent von einem Kilogramm Leber in einem Lauf zu flotieren.

Die Ausbeute an Protein in der membranhaltigen Fraktion aus einem Kilogramm Frischleber beträgt 1-2g. Die Anreicherung der 5'-Nucleotidase und der alkalischen Phosphatase ist 24 bis 30 fach, womit dieses Präparationsverfahren vorwiegend eine Anreicherung der gallenseitigen Oberfläche der Leberzelle liefert.

Die Succinatdehydrogenase und die Glukose-6-Phosphatase als Leitenzyme der Mitochondrien bzw. des Cytoplasmas sind auf weniger als 0.5% des Rohhomogenats reduziert.

2. Einleitung

Die Methoden der Trennung von Plasmamembranen von anderen Zellbestandteilen beruhen auf der Ausnutzung physikalischer, nicht jedoch chemischer oder biochemischer Eigenschaften der Plasmamembranen.

Beispielsweise wird ihre negativ geladene Oberfläche zu einem Trennverfahren herangezogen, bei dem sie an positiv geladene Oberflächen von Glaskugeln adsorbiert werden (1,2,3).

Die gleiche Eigenschaft führt in der trägerfreien Elektrophorese zur Trennung von inside-out und outside-out Vesikeln (4). Auch die Anreicherung der Plasmamembranen an einer lipophil/hydrophilen Grenzschicht - erstmals von Brunette und Till (5) zur Gewinnung von Plasmamembranen in konsequenter Fortführung der von Albertsson entwickelten Methodik (6) eingesetzt - beruht vorwiegend auf der elektrostatischen Eigenschaft der Plasmamembranen, weniger auf ihrer Hydrophilie bzw. -phobie.

Der früheste erfolgreiche Versuch zur Gewinnung von Plasmamembranen aus Säugetierorganen bedient sich der charakteristischen Auftriebsdichte und aller jener im Schwerfeld bedeutsamer Eigenschaften, die in der Sedimentationskonstanten zum Ausdruck kommen. Diese Verfahren wurden in der Folgezeit am häufigsten angewandt und ihren Ergebnissen verdanken wir die heutigen Kenntnisse über die chemische Zusammensetzung und das funktionelle Verhalten der Membranen. Die Möglich-

keit der Modifikation der Methodik in Anpassung an das jeweilige Problem wurde wiederholt in Übersichten dargestellt (7,8) und auch an genauen Arbeitsvorschriften fehlt es nicht (9,10).

Die Technik der Trennung im Gravitationsfeld hat im Laufe der Zeit erhebliche apparative Änderungen erfahren, mit entsprechendem Niederschlag in den Ergebnissen. So zeitigte beispielsweise die Einführung der Zonalrotoren in die Membranpräparation zwei Fakten: Zum einen wurde es erstmals möglich, Organhomogenate in präparativem Maßstab unter Bedingungen der Winkelgeometrie zu zentrifugieren. Damit ließen sich Informationen über das Sedimentationsverhalten von Zellorganellen in Abhängigkeit von der Form des Sucrosegradienten gewinnen (11,12). In diesen Studien wurden jeweils vier bis acht Gramm Leber eingesetzt; zweitens verschob die Anwendung der Zonalrotoren beträchtlich die Grenze der Organmenge, die aufgearbeitet werden konnte. Plasmamembranen wurden durchschnittlich aus 80 Gramm, in einem Fall sogar aus 200 Gramm Leber in einem Lauf erarbeitet (13).

Solche Größenordnung ist eine Voraussetzung für das in der ersten Mitteilung über Membranpräparationen aus Rattenleber (14) gesetzte Ziel:

'Our interest in obtaining membranes from cells responsive to certain hormones ... let us attempt to isolate membranes from rat liver'.

Diese Formulierung darf als Ausdruck der umfassenden Absicht verstanden werden, die Funktion biologischer und morphologischer Entitäten auf der Basis biochemischer Mechanismen und biophysikalischer Gesetzmäßigkeiten zu verstehen. Hierzu muß in den meisten Fällen eine ausreichende Menge an Material zur Verfügung stehen.

Auf diesem Hintergrund hat die Gewinnung großer Mengen von Plasmamembranen nichts an Attraktivität verloren, trotz aller Fortschritte auf dem analytischen Sektor - z.B. in Richtung Mikroanalyse - die teilweise Präparationen großer Organmengen kompensieren können.

Der erste Ansatz, die Plasmamembranen der Leberzelle nicht mehr als homogene Qualität zu sehen, sondern sie zu differenzieren, läßt sich aus der Arbeit von Touster et al. (15) ablesen. Er zeigte, daß sich die spezifischen Aktivitäten der Leitenzyme der Plasmamembranen zu ungleichen Größen in den präparierten Fraktionen, die sich bezüglich Auftriebsdichte und Sedimentationsgeschwindigkeit unterscheiden, wiederfinden lassen. Die morphologische Charakterisierung der unterschiedlichen Fraktionen ergab Vesikel und Flächen im Querschnitt.

Evans führte dieses Konzept weiter und erarbeitete Zentrifugationsverfahren, um die unterschiedlichen Bereiche der Oberfläche der Leberzelle anzureichern (16,17,18).

Er erhielt Fraktionen, in denen entweder biliäre

Teile, Kontaktbereiche der Zelle oder auch Vesikel aus der sinusoidalen Oberfläche angereichert waren. Damit lagen die biochemischen Äquivalente der lange bekannten morphologischen Beschreibungen der Plasmamembranen der Leberzelle vor.

2.1. Problemstellung:

Die vorliegende Arbeit beabsichtigt zunächst die Erprobung einer weiteren technischen Möglichkeit: mittels Durchflußzentrifugation soll eine Trennung der Zellpartikel aus Gewebehomogenat versucht werden.

In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Rotortypen zur Durchflußzentrifugation entwickelt - zu detaillierten Informationen über technische Daten und Möglichkeiten der Anwendung, siehe Referenzen (19,20,21,22) - und ihr Nutzen zur Anreicherung von Viren oder Bakterien ist fraglos. Aber Daten über die Fraktionierung von Gewebehomogenaten, speziell mit dem Ziel der Anreicherung von Plasmamembranen unter Verwendung des SZ-14 Rotors (Sorvall) oder des JCF-Z Rotors (Beckmann) mit einem high-capacity-core sind nicht vorhanden. Die Ursache ist leicht auszumachen: während Viren und Bakterien sich in ihren Sedimentationsparametern deutlich vom Medium, von dem sie getrennt werden sollen, unterscheiden, nehmen die $S_{w,20}$ -Werte der Fraktionen der Gewebehomogenate mit Svedbergeinheiten von 10^3 bis 10^7 ein relativ enges Spektrum ein.

Die experimentell zu beantwortende Frage lautet daher: ist es möglich, Sedimentationsbedingungen im Durchfluß zu finden, die die geringen Unterschiede im Sedimentationsverhalten der Organellen für deren zufriedenstellende Trennung ausnützen?

Der zweite Gesichtspunkt dieser Arbeit betrifft Qualität und Quantität der zu präparierenden Membranen. Es wird angestrebt, die in der Literatur angegebene Maximalmenge von 200 Gramm Leber (13) deutlich zu übertreffen. Dabei ist es folgerichtig, bei einer Präparation großer Mengen auch die Wahl des Organes in die Überlegung mit einzubeziehen. Rinder- und Schweineleber werden der beabsichtigten Größenordnung gerecht und wurden bereits zu Membranpräparationen herangezogen (23,24,25). Aber auch die Qualität der Membranen sollte einem distinkten Oberflächenabschnitt der Leberzelle zuzuordnen sein.

3. Materialien und Methoden

3.1. Analytik

Die in den vorliegenden Proben bzw. Fraktionen vorhandenen Gehalte an Protein und spezifischen Enzymaktivitäten sowie die Referenzsubstanzen wurden wie folgt bestimmt:

- 1) Protein nach der Methode von Lowry et al. (26).
Im Bereich zwischen 10 und 200 $\mu\text{g/ml}$ diente Lab-Trol als Standard. Die Eichkurve wurde einem Polynom zweiten Grades angepaßt.
- 2) Anorganisches Phosphat nach Fiske und Subba Row (27).
- 3) 5'-Nukleotidase (EC 3.1.3.5) nach Touster et al. (15).
- 4) Phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) nach Touster, mit der einzigen Abwandlung, daß die Freisetzung des p-Nitrophenols durch dessen Absorption bei 405 nm kinetisch gemessen wurde.
- 5) Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) nach Hausamen et al. (28) unter Benutzung des Testsatzes von Boehringer/Mannheim.
- 6) Glukose-6-Phosphatase (EC 3.1.3) nach Baginski et al. (29).
- 7) Succinatdehydrogenase (EC 3.1.99.1) durch Bestimmung des reduzierten 2-(Jodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorids -abge-

kürzt INT- mit Succinat als Wasserstoff-acceptor (30). (Die Bezeichnung sollte daher exakter Succinat-INT-Reduktase lauten).

3.2. Reagentien

Alle benutzten Reagentien wurden von Merck/Darmstadt bezogen, mit Ausnahme der folgend aufgeführten:

- 1) Adenosin-5-monophosphat und 2-Desoxythymidin-p-nitrophenylphosphat von Boehringer/Mannheim;
- 2) INT von Fluka;
- 3) Na-Cacodylat von Serva;
- 4) Lab-Trol von Dade.

3.3. Lösungen

Der zur Präparation benutzte Puffer enthielt 10 mMol/l Tris/HCl, pH 7,6 - 7,7 . Angaben über Verdünnungen oder Suspensionen beziehen sich auf das Eingangsgewicht der Leber. Alle Sucroslösungen enthielten 10 mMol/l Trispuffer und waren bei Zimmertemperatur auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt. Die Lösungen wurden auf der Basis von Gewichtsprozenten angesetzt und bei Zimmertemperatur mit einem Abbé-Refraktometer überprüft.

3.4. Abkürzungen und Symbole

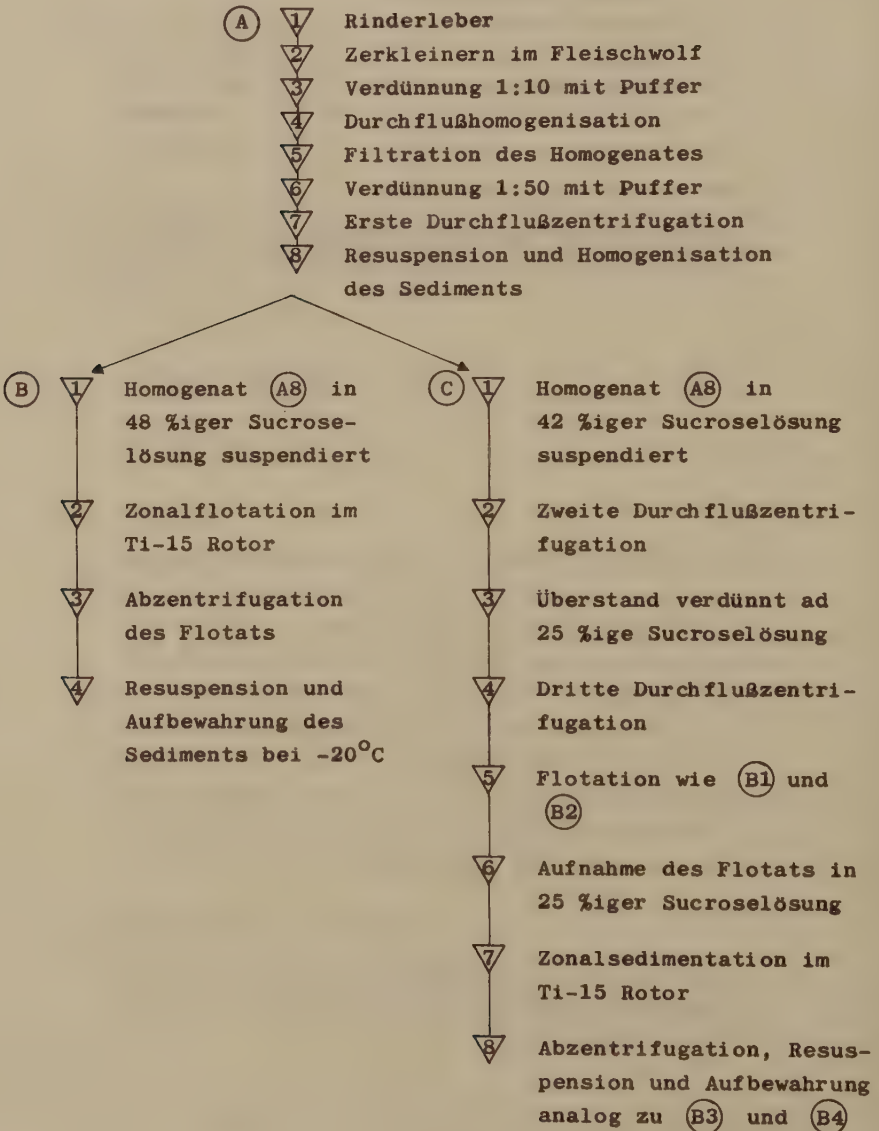
Aus Gründen der Vereinfachung werden im Text und den Tabellen folgende Abkürzungen verwandt:

5'-Nukleotidase	- 5'-Nu
Alkalische Phosphatase	- AP
Phosphodiesterase	- PDE
Glukose-6-Phosphatase	- G-6-P
Succinatdehydrogenase	- SDH
Dimethylsulfoxid	- DMSO
Desoxyribonukleinsäure	- DNS

Die Svedberg-Konstante $[10^{-13}] \text{ sec}$ wird mit dem Symbol $S_{w,20}$ bezeichnet.

Andere benutzte Zeichen, Symbole oder Abkürzungen und deren Dimension werden jeweils dort erläutert.

4. Flußdiagramm des Verfahrens zur Präparation von
Leberzellmembranen:



4.1. Erläuterungen zum Flußdiagramm

Zur Ergänzung des vorstehenden Flußdiagrammes der Präparation folgt eine nähere Beschreibung einzelner Schritte. Die Bezeichnungen entsprechen der Nummerierung im Diagramm.

Der Ablauf in Zweig (A) und (B) stellt das erste Präparationsverfahren dar, bestehend aus einer Durchflußzentrifugation -A- und einer Zonal-floation -B-.

Die methodische Variante des Zweiges (C) besteht im Zwischenschalten von zwei weiteren Durchfluß-zentrifugationen:

Schritt (A1)

Eine schlachtfrische Rinderleber wird auf dem Schlachthof in etwa 150 Gramm große Scheiben geschnitten, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, ins Labor gebracht und in einem Stickstoffkühlbehälter aufbewahrt. Zum Zeitpunkt der Präparation werden die gefrorenen Stücke entnommen und in Puffer bei -6°C aufgetaut.

Schritt (A4)

Zur Durchflußhomogenisation dient uns ein Apparat, der ursprünglich zum Dispergieren entwickelt wurde (Internationale Laboratoriumsapparate GmbH, Modell 48 Z, Dottingen, BRD). Der Homogenisator arbeitet bei 17000 Umdrehungen pro Minute (UPM). Der Abstand zwischen Rotor und Stator kann zwischen 0,2 und 1,2 Millimeter stufenlos verstellt werden. Der Durchmesser der Ausflußöffnung von 27 Millimeter wurde so verändert, daß eine schrittweise Reduktion von 5 bis 1,6 mm möglich ist (Abbildung 1). Der Durchfluß von 2,7 l/min resultiert aus dem Gleichgewicht zwischen dem hydrostatischen Druck der

Suspension im Trichter des Homogenisators und dem Widerstand, der durch die Größe des Durchmessers des Ausflusses bestimmt wird.

Schritt (A5)

Zur Filtration des Rohhomogenates werden Nylonnetze (G. Mayerthaler KG Köln, BRD) in folgender Reihenfolge der Porengröße benutzt:

1000 μm $\rightarrow$ 500 μm $\rightarrow$ 250 μm $\rightarrow$ 100 μm .

Schritt (A7)

Die Standardbedingungen für die erste Durchflußzentrifugation sind 18000 UPM und ein Durchfluß von 50 l/h. Das kann sowohl mit dem SZ-14 Rotor in der RC 2B Zentrifuge (Sorvall), als auch unter Verwendung des JCF-Z Rotors mit dem high-capacity-core in der J-21B Zentrifuge (Beckmann) durchgeführt werden.

Um Vergleichsmöglichkeiten in einer Serie von Experimenten zu erhalten, benutzten wir die Konfiguration von Sorvall (siehe Abbildung 7).

Schritt (B1)

Das mittels Teflonpotter homogenisierte Sediment A8 - äquivalent einer Menge von 150 Gramm Leber - wird mit einer 65 %igen Sucroslösung verrührt, bis die Suspension eine Konzentration von 48 % aufweist.

Das entspricht einem Volumen von 450 bis 500 ml. Die anschließende Flotation ergibt optimale Ergebnisse, wenn diese Suspension für ca. 10 bis 12 Stunden bei 6°C gerührt wird.

Schritt (B2)

Einen Querschnitt durch den zur Flotation vorbereiteten Ti-15 Rotor zeigt die Abbildung 2.

Der Aufbau des Gradienten wird über einen LKB

Ultragrad Gradientenformer gesteuert. Lösungen, Pumpe und die Mischkammer mit einem Volumen von 5ml werden in Reihe angeordnet. Die Steigung des Gradienten ist linear mit dem Volumen und somit hinsichtlich des Radius des Rotors konkav.

Der Rotor wird von der Peripherie her bei 3000 UPM geladen, angefangen mit 900 ml Gradientenflüssigkeit, gefolgt von 450 bis 500 ml Probe und abschließend 150 ml 50 %ige Sucroselösung als Cushion.

Die Füllgeschwindigkeit beträgt 60 ml/min. Alle Lösungen sind vorgekühlt, und die Temperatur sollte während des Füllvorganges nicht über 10°C ansteigen. Nach Beendigung des Füllens wird der Rotor auf 30000 UPM beschleunigt und eine Stunde lang zentrifugiert.

Schritt ⑧3

Danach läßt man die Geschwindigkeit des Rotors ohne Bremse auf 3000 UPM abfallen. Das Entladen erfolgt wiederum von der Peripherie her durch Verdrängen des Inhaltes mittels einer 60 %igen Sucroselösung. Das Flotat wird in Fraktionen zu 20 ml geteilt, die membranhaltigen Röhrchen werden gesammelt, mit zwei Volumen Puffer verdünnt und für 10 Minuten bei 10000 UPM in einem GSA-Rotor (Sorvall) sedimentiert.

Schritt ②2

Die Durchflußzentrifugation erfolgt in einem JCF-Rotor mit high-capacity-core. Die Anordnung der Lösungen im Rotor zeigt die Abbildung 3. Die Konzentration der peripheren Sucroselösung liegt zwei Prozent über der im Zentrum, dessen Volumen 100 bis 120 ml beträgt. Das verdünnte Homogenat mit einer ursprünglichen Konzentration von 42 % Sucrose muß so eingestellt werden, daß es die

gleiche Dichte hat wie die zentrale Sucrose-lösung in der Rotorschüssel.

Das Laden des Rotors geschieht von der Peripherie her bei 3000 UPM unter Verwendung vorgekühlter Lösungen bei 5°C. Zuerst werden 200 ml einer 42 %igen Sucroslösung eingepumpt; dann folgt solange eine 44 %ige Lösung, bis aus dem zentralen Kanal 100 ml ausgetreten sind. Jetzt wird die Flußrichtung umgekehrt, die Umdrehungszahl auf 18000 UPM beschleunigt und das Homogenat bei einem Durchfluß von 120 ml/min zentrifugiert.

Da wir die Zentrifugation einer 40 %igen Sucroslösung im Durchfluß anfangs nicht problemlos fanden, sollen die Maßnahmen angeführt werden, mit denen wir das Verfahren reproduzierbar handhaben konnten:

- a) der Durchfluß darf 100 ml/min nicht unterschreiten, da sonst die nicht abgeführte Wärme zu einem Anstieg der Temperatur des Homogenates auf mehr als 40°C - gemessen an der Ausflußöffnung - führt. Aus dem Unterschied der Temperaturen zwischen Ein- und Auslaß, der Wärmekapazität der Lösungen und der Durchflußmenge läßt sich die aus der Reibung resultierende Wärmemenge zu 5 bis 10 kJ/min berechnen.
- b) Die Rotortemperatur ist auf 5°C vorzuzählen.

- c) Wir frästen eine ringförmige Nut in das stationäre Seal (Abbildung 4), in der Vorstellung, daß eine Vergrößerung des Raumes, in dem der Strömungsvektor des Homogenates von einer longitudinalen in eine Kreisbewegung umgelenkt wird, den Effekt der Reibung vermindert.

Durch diese Vorkehrungen erreichten wir, daß die Temperatur an der Auslaßöffnung 20°C nicht überstieg.

Schritt C3

Die zweite Durchflußzentrifugation im JCF-Rotor ist eine einfache Sedimentation der Partikel aus einer 25 %igen Sucroslösung. Das gewonnene Sediment wird behandelt, wie bereits unter B1 beschrieben.

Schritt C7

Im Gegensatz zu Schritt 3 in Zweig B des Flußdiagramms wird das Material durch eine weitere Sedimentation im Ti-15 Rotor gereinigt. Der Aufbau des Gradienten und das Be- und Entladen des Rotors werden durchgeführt, wie unter B2 beschrieben. Der Rotor enthält vom Zentrum zur Peripherie 200 ml des verdünnten Flotats, dann 900 ml eines linearen Sucrosegradienten von 30 bis 45 Prozent. Die endgültigen Membranen erhält man durch Abzentrifugieren aus der Sucroslösung analog zu B3 und B4.

5. Ergebnisse und Diskussion

Präparationsverfahren zur Gewinnung von Plasmamembranen, die unter dem Gesichtspunkt des "large scale" referiert werden, konzentrieren ihre Bemühungen durchweg darauf, die isopyknische Flotation - das Nadelöhr der Präparation - mit größeren Mengen durchführen zu können. Hier hat der Einsatz von Zonalrotoren bisher die Kapazität auf maximal 200 Gramm Leberäquivalent erhöhen können. Demgegenüber versuchten wir, den Begriff des "large scale" auf allen Ebenen der Präparation zu etablieren:

der Wahl des Organes,
des Homogenisationsverfahrens und
der Zentrifugationsmethoden.

5.1. Wahl des Organes:

Das Gewicht einer Rinderleber liegt zwischen fünf und acht Kilogramm. Damit ist die Möglichkeit gegeben, von einer Leber mehrere Präparationen durchzuführen.

Die Aufbewahrung dieses Gewebes schien nach dem von Fleischer und Kervina (31) mitgeteilten Verfahren möglich, indem es in flüssigem Stickstoff gefroren und auch in einem Stickstoffkühlbehälter aufbewahrt wurde.

Jedoch war unsere Behandlung der Leber im Vergleich zu der Methode von Fleischer grober. Die Leber wurde nicht als Homogenat eingefroren, sondern in Stücke geschnitten und ohne Zugabe von DMSO.

Dadurch läuft der Gefriervorgang des Gewebes insgesamt verzögert ab. Es ist aber fraglich,

ob dieser Effekt einen Einfluß auf die Qualität des aufbewahrten Gutes hat, wenn man in Betracht zieht, daß die Leber frühestens zwanzig Minuten nach dem Tod des Tieres eingefroren werden kann. Möglicherweise sind zu diesem Zeitpunkt alle Unterschiede in der Qualität des Gewebes, auf die sich differente Gefriertechniken auswirken können, bereits verschwunden. Aufbewahrung bis zu zwei Monaten ergab bei uns keinen Unterschied bezüglich der Enzymaktivitäten im Vergleich zu frischer Leber.

Unserem Vorgehen lagen praktische Erwägungen zugrunde:

Es ist technisch einfacher, am Schlachthof die frische Leber in Stücke zu schneiden und so in flüssigem Stickstoff einzufrieren, als die Prozedur der Homogenisation dort vorzunehmen, und das Homogenat später im Laboratorium zu gefrieren.

5.2. Homogenisation:

Vom theoretischen Standpunkt ist der zum Dispergieren entwickelte Apparat auch gut zur Durchflußhomogenisation geeignet. Durch Variation der Messerabstände und Durchflußmengen versuchten wir zunächst, deren Einfluß auf das resultierende Homogenat zu eruieren. Verschiebung der Distanz zwischen Rotor und Stator von 0,2 bis 0,8 Millimeter schlug sich nicht in Unterschieden der Enzymaktivitäten oder dem Zentrifugationsverhalten nieder. Bei größeren Abständen als 0,8 mm blieb mehr Bindegewebe intakt, das aber in den folgenden Siebungen zurückgehalten wurde.

Die Durchflußgeschwindigkeit der Suspension - reziprok der Homogenisationszeit - spiegelt sich in der Zahl der mikroskopisch zählbaren Zellkerne wider.

Aus Abbildung 5 geht hervor, daß die Ausflußöffnung des Homogenisators, die Zahl der intakten Kerne und die Durchflußgeschwindigkeit korrelieren. Verglichen mit der Zahl der Kerne in Ratten- oder Schweineleber - 2×10^8 bzw. $3,5 \times 10^8$ n/g (32) - beträgt die Anzahl der im Homogenat gefundenen Zellkerne je nach Homogenisationsbedingungen und Bezugsorgan 10 bis 30 Prozent.

5.3. Das Leberhomogenat:

Die enzymatische Charakterisierung der Rinderleber auf der Stufe des Rohhomogenates nach der Filtration (A5) wird in Abbildung 6 und der ersten Spalte der Tabelle I dargestellt. Diesen Daten liegen 31 Präparationen aus acht Lebern zugrunde. Die Werte der Enzymaktivitäten streuen um das zwei- bis dreifache in der Gesamtpopulation der Präparationen, der Proteingehalt reicht von 120 bis 200 mg/g Frischleber.

Die Formen der Häufigkeitsverteilungen in Abbildung 6 sind unterschiedlich. Die Verteilung der Proteinhäufigkeiten ist asymmetrisch linksverschoben, wie es bei Kollektiven der Fall ist, die gegen einen absoluten Wert streben. Die Verteilungskurven der Aktivität der Enzyme scheinen einander ähnlich. In den jeweiligen Präparationen besteht keine Korrelation zwischen den Aktivitäten verschiedener Enzyme oder der Enzyme zum Proteingehalt.

Auf der Suche nach der Ursache für die Streuung der Werte verglichen wir den Variationskoeffizienten, wie er sich unter Berücksichtigung aller Präparationen mit den Variationskoeffizienten berechnen läßt, die sich aus der Anzahl der Präparationen aus jeweils einer Leber ergeben (Tabelle II, $S/\bar{X}$ gegen $1/n \sum S/\bar{X}_1$).

Der prozentuale Fehler, der sich aus den Präparationen aus einer Leber ergibt, liegt um den Faktor drei bis vier niedriger im Vergleich zum Variationskoeffizienten aus allen Präparationen. Dies erlaubt die Annahme, daß die Ursache der Streuung nicht in der Analytik liegt, sondern in den Lebern selbst zu suchen ist.

Trotz der großen Streuung der Absolutwerte in den Rohhomogenaten des Gesamtkollektivs der Präparationen sind wir der Meinung, daß die im Verhältnis zum Rohhomogenat ermittelten Werte der jeweiligen Präparationsstufen verläßlich sind und im Gegensatz zu den Absolutwerten einen Vergleich der Effektivität der Präparationsverfahren ermöglichen. Aus diesem Grunde sind die Werte in Tabelle I, Spalte A8 bis C7 in Prozent des Rohhomogenates angegeben.

Dem Phänomen der Streuung von Enzymaktivitäten in Lebern und deren Auswirkung auf die Beurteilung von Präparationsverfahren von Zellorganellen ist bislang wenig Beachtung geschenkt worden. Derartige Hinweise oder gar Berechnungen fehlen auch in zwei vorange-

gangenen Arbeiten über Präparationen von Plasma- und Golgimembranen aus Rinderleber (24,25). Lediglich Touster (15) und Evans (33) berichten über Unterschiede in der Aktivität der 5'-Nu um den Faktor zwei. Aber diese Tatsache beeinträchtigt ebensowenig dort wie in dieser Arbeit einen Vergleich der Präparationen, wenn die spezifische Aktivität nicht absolut, sondern in Relation zum Rohhomogenat angegeben wird.

Evans und Touster gewannen ihre Membranen aus Mäuse- bzw. Rattenleber. Da in einem Kollektiv, das unter standardisierten Bedingungen aufgezogen wurde, eine Streuung der Werte um den Faktor zwei auftritt, darf angenommen werden, daß die beträchtlichen Schwankungen unter den Rinderlebern schon im Tierkollektiv begründet sind, das nicht unter vergleichbaren Verhältnissen aufwuchs.

5.4. Durchflußzentrifugation

(Erster Präparationsabschnitt - Zweig A/B des Präparationsschemas)

Die Trennung von Zellorganellen im Schwerfeld ist möglich aufgrund unterschiedlicher Dichten und Sedimentationsgeschwindigkeiten - genauer $S_{w,20}$ -Werte - der Partikel. Unter Bedingungen der stationären Zentrifugation, wie die üblichen Verfahren im Festwinkel- oder Ausschwingrotor im Gegensatz zur Durchflußzentrifugation kurz bezeichnet werden sollen (der Ausdruck "stationär" bezieht sich dabei auf das Homogenisationsgut), hängt das Ergebnis weitgehend von der Geometrie des Rotors, der

Umdrehungsgeschwindigkeit und der Konzentration des Homogenates ab. Es ist die entscheidende Frage, ob in der Durchflußzentrifugation die Ergebnisse in gleichem Umfang durch die verfügbaren Parameter beeinflusst werden wie bei der stationären Zentrifugation, und damit in gewissem Ausmaß berechenbar sind.

Auf den ersten Blick wird man der Winkelgeschwindigkeit und der Konzentration des Homogenates vergleichbare Effekte bei den Zentrifugationsmethoden zuschreiben. Die Durchflußgeschwindigkeit des Homogenates bei der Durchflußzentrifugation ersetzt den Parameter der Zentrifugationszeit in der stationären Zentrifugation und bestimmt damit den Betrag von $\omega^2 t$. Diesen Überlegungen liegt die Annahme zugrunde, daß der Durchfluß des Homogenates sich im Rotor in einer homogenen und laminaren Strömung bewegt, wodurch alle Partikel den gleichen Bedingungen - Dichte, Schwerfeld und Strömungsvektor - unterliegen. Darüber hinaus müßte die Form des Vektorfeldes der durchfließenden Lösung unabhängig von der Geschwindigkeit des Flusses sein.

Die Ergebnisse eines Versuches, in Analogie zur Differentialsedimentation im Festwinkelrotor durch Variation von Winkel- und Durchflußgeschwindigkeit des Homogenates, eine wirksame Auftrennung der Partikelqualitäten zu erreichen, sind aus Abbildung 7 zu sehen.

Die Abszisseneinheit - relative $\omega^2 t$ - ist aus den Volumendurchsätzen im Rotor und dessen Winkelgeschwindigkeit errechnet. Die reziproke

Flußzeit ist proportional der Zentrifugationszeit angenommen. Jedoch bedingt die unbekannte, aber bei den jeweiligen Durchflußgeschwindigkeiten sicherlich differente Strömungsform des Homogenates im Rotor auch eine unterschiedliche Verweildauer der Partikel. Dieser Tatsache konnte bei der Berechnung von $\omega^2 t$ nicht Rechnung getragen werden.

Die größte Zunahme der Leitenzyme der Plasmamembranen im Sediment geschieht bis zu fünf relativen $\omega^2 t$, äquivalent 3000 bzw. 5000 UPM. Bis zu diesem Kurvenpunkt sind ca. 35 Prozent der 5'-Nu und der AP sowie 10 Prozent des Proteins aus dem Rohhomogenat sedimentiert. Erhöhung der Winkelgeschwindigkeit oder Abnahme des Durchflusses steigert die Ausbeute der Leitenzyme der Plasmamembranen auf 50 bis 60 und die der Proteine auf 20 bis 25 Prozent. Die beste Relation zwischen Leitenzymen und Protein, d.h. die höchste Anreicherung, liegt im ersten, steileren Teil der Kurve. Es ist möglich, daß der flachere Kurvenabschnitt eine vom ersten Teil bezüglich Dichte und Sedimentationsgeschwindigkeit unterschiedliche Qualität der 5'-Nu und AP tragenden Partikel indiziert.

Unsere Routinepräparationen liefen bei 18000 UPM und einem Durchfluß von 50 l/h ab. In einem Lauf von neunzig Minuten Dauer konnten wir so 75 Liter Homogenat - entsprechend 1,5 Kilogramm Leber - zentrifugieren. Das Pellet lag dann als 1,5 bis 2 Zentimeter dicke, dunkelbraune Schicht an der Rotorwand. Die

enzymatische Charakterisierung des Sediments ist in Tabelle I und III dargestellt. Betrachtet man die Größenordnung der Werte in Spalte A8, so lassen sich folgende Ergebnisse unterscheiden:

Protein und G-6-P findet man zu fast zwanzig Prozent im Sediment, die Leitenzyme zu 45 Prozent, PDE und SDH liegen mit 30 bis 40 Prozent dazwischen.

Eine Wiederholung dieses Zentrifugations-schrittes mit dem Sediment brachte keine weitere Anreicherung der Leitenzyme oder Abnahme der Mitochondrien.

5.5. Zonalflotation

(Zweig B des Präparationsschemas)

Üblicherweise folgt die Zonalflotation der Differentialsedimentation. Die Ausbeute in Prozentangabe ist in Tabelle I, Spalte C5 - B3 beschrieben. Die jeweiligen Werte unterscheiden sich in der erreichbaren Rotorkapazität. Diese beträgt nach nur einer Durchfluß-zentrifugation (B3) bei Anwendung des Ti-15 Rotors 150 bis 200 Gramm Leber. Überschreiten dieser Menge führt zu Überladung des Rotors, dadurch läßt sich weder Ausbeute noch Anreicherung verbessern. Auch die Ergebnisse anderer Autoren bewegen sich in ähnlichen Größenordnungen. Smigel flotierte beispielsweise zur weiteren Reinigung der Plasmamembranen ein Sediment, das er aus 200 Gramm Rattenleber gewann (13).

5.6. Erweitertes Präparationsverfahren unter Einschaltung zweier zusätzlicher Durchflußzentrifu-

gationen (Zweig C des Präparationsschemas)

Die weiteren Durchflußzentrifugationen zielen darauf ab, alles biologische Material, dessen Dichte nicht der der Membranen entspricht, vor der Flotation zu entfernen. Der Erfolg der zweiten Durchflußzentrifugation wird nicht ersichtlich, mißt man ihn an den in Tabellen I und III, Spalte C3 angeführten Daten im Vergleich zu denen in der Spalte A8. Der Proteingehalt oder die Enzymaktivitäten liegen im Überstand nur geringfügig niedriger als im vorhergehenden Sediment. Auch das bei diesem Präparationsschritt anfallende Sediment - Tabelle I, Spalte C3 - unterstützt diesen Eindruck.

Aufschlußreicher ist dessen makroskopische - die Rotorwand ist von einer 2 bis 3 Millimeter dicken, weißlichen, glasig schleimigen Schicht bedeckt - besonders aber die mikroskopische Inspektion: es finden sich massenhaft Zellkerne, intakte Zellen und Zelltrümmer sowie fadenförmiges Material. Im Gegensatz dazu sind im Überstand die Zellkerne verschwunden. Die relative, auf Protein bezogene Aktivität der Enzyme im Überstand bleibt im Vergleich zum vorhergehenden Sediment unverändert, die enzymatischen Aktivitäten an 5'-Nu, AP und SDH im Sediment sind weitgehend den intakten Zellen zuzuschreiben.

Im dritten Lauf werden die Membranen aus einer 25 %igen Sucroslösung, entsprechend einer Dichte von $1,1062 \text{ g/cm}^3$ bei 10°C , pelletiert. Das auffallendste Ergebnis liegt in der Reduktion des Proteins auf 3 bis 5 Prozent des Rohhomo-

genates sowie der überwiegenden Entfernung der mikrosomalen Fraktion, reflektiert im Verlust an G-6-P, und einer guten Ausbeute der Leitenzyme der Plasmamembranen. $5'\text{-Nu}$ und AP sind um den Faktor 5 bis 7 angereichert, die PDE nur geringfügig.

Folgende Überlegungen ließen die Anwendung der beschriebenen Zentrifugationen im Durchflußverfahren sinnvoll erscheinen: Als sich herausstellte, daß eine weitere Anreicherung von Plasmamembranen unter Ausnutzung der Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel in der Differentialsedimentation nicht möglich ist, versuchten wir, die anschließenden Schritte unter Einbeziehung der Dichte der Partikel zu entwerfen. Das Sediment aus dem ersten Lauf wurde so in einer Sucroselösung aufgenommen, daß die Dichte der Suspension um lediglich $0,01 \text{ g/cm}^3$ niedriger lag, als die des Cushions, gegen das sie zentrifugiert wurde.

Es ist einleuchtend, daß kein Material mit einer geringeren Dichte als $1,2014 \text{ g/cm}^3$ bei 10°C , was einer Sucroselösung von 44 Prozent entspricht, - unabhängig von seiner Sedimentationsgeschwindigkeit - ins Cushion penetrieren kann. Aber auch nicht alle Partikel, die schwerer sind, werden dort hineinwandern. Es können nur jene sein, deren $S_{w,20}$ -Wert so groß ist, daß sie während der Verweildauer im Rotor die Strecke aus dem durchströmten Raum bis ins Cushion zurücklegen können. Teilchen mit geringeren $S_{w,20}$ -Werten werden trotz ausreichender Dichte mit dem Flüssigkeitsstrom den Rotor wieder verlassen. Die Fraktionierung des Homogenates erfolgt

somit in einem Rotor und Zentrifugationsgang sowohl nach dem Prinzip der Differential-sedimentation als auch der isopyknischen Zentrifugation.

In Abbildung 8 sind diese Überlegungen unter den realen Bedingungen der Zentrifugation - 18 000 UPM, das Durchflußvolumen des Rotors beträgt 120 ml, das verbleibende Volumen ist mit einer 44 %igen Sucroslösung gefüllt - berechnet und dargestellt. Unter der Annahme einer homogenen, laminaren Strömung bleibt jedes Partikel etwa eine Minute dem Zentrifugationsfeld ausgesetzt. Während dieser Zeit kann es von der Peripherie des Cores zum Beginn des Cushions wandern.

Die Kurven in Abbildung 8a geben die Menge der sedimentierten Fraktionen (Ordinate) in Abhängigkeit von Dichte (Kurvenschar) und Sedimentationskoeffizienten (Abszisse) wieder. Die Kurve mit einer Dichte von $1,21 \text{ g/cm}^3$ stellt die Grenze zwischen sedimentierendem und nicht sedimentierendem Material dar. Partikel mit $S_{w,20}$ -Werten größer als 10^6 werden zu 100 Prozent im Cushion gefunden. Abnahme dieser Werte auf 10^5 wird die Menge des sedimentierenden Gutes auf nahezu 5 Prozent reduzieren. Die Folge der Kurven, die den Dichtebereich von $1,21$ bis $1,5 \text{ g/cm}^3$ überstreichen, zeigt, daß der Einfluß größerer Partikeldichten eine Abnahme der $S_{w,20}$ -Werte nicht kompensieren kann. Vergleichsweise dazu berechnete Anderson (34), daß unter Bedingungen der kombinierten rate-zonal und isopyknischen Trennung bei Partikeln mit

$S_{w,20}$ -Werten zwischen 500 und 1500 der Einfluß der Dichte bemerkenswert größer ist, als der des Sedimentationskoeffizienten.

Obwohl dieser theoretische Abriß nur eine grobe Näherung an die konkrete Situation darstellt, begründet er doch die prinzipielle Richtigkeit unseres Vorgehens und erklärt darüber hinaus qualitativ den Ausfall des Experimentes unter Berücksichtigung der physikalischen Eigenschaften der Partikel aus Leberzellen, wie sie von Anderson et al. (35) angegeben wurde:

Nur Kerne und intakte Zellen haben aufgrund ihrer $S_{w,20}$ -Werte eine Chance, vollständig aus dem Homogenat entfernt zu werden. Glykogen und Peroxysomen sedimentieren teilweise, aber keine DNS, trotz ihrer hohen Dichte. Auf diesem Hintergrund scheinen dann auch die analytischen Ergebnisse - geringer Verlust an Protein und Enzymaktivitäten - vernünftig.

In Abbildung 8b werden diese Überlegungen für die dritte Durchflußzentrifugation wiedergegeben. Hier liegt die Grenze der Dichte für Partikel, die noch eine Chance zur Sedimentation haben, bei $1,10 \text{ g/cm}^3$.

Der Verlust an Leitenzymen der Plasmamembranen auf dieser Stufe ist am wahrscheinlichsten auf die Heterogenität der verschiedenen Abschnitte der Plasmamembranen bezüglich Dichte und Sedimentationskoeffizienten zurückzuführen. Das deckt sich mit den Beobachtungen von Evans (16,17,18), der den jeweiligen Oberflächenabschnitten der Zellen - sinusoidal, benachbart und biliär - Dichten zwischen $1,11$ und $1,18 \text{ g/cm}^3$

zuschreibt.

Die Effektivität der gewählten Lösungsmittel-anordnung im Rotor wird noch durch eine weitere Rechnung unterstützt: Durch Reduktion des Gesamtvolumens des Rotors auf ein Durchströmungsvolumen von 120 ml geht der k-Wert von ca. 440 auf 140 zurück.

In diesem Verfahren könnte die Stabilität des Stufengradienten als ein kritischer Punkt im Verlauf der Zentrifugation angesehen werden. Sie wurde daher experimentell überprüft (unveröffentlichte Ergebnisse Petras):

Die 42 %ige Sucroslösung wurde mit Ferroin versetzt und die Absorption der durchfließenden Lösung bei 508 nm in einer Durchflußzelle kontinuierlich gemessen.

Die Extinktion blieb während einer mehrstündigen Zentrifugation bei 18000 UPM konstant. Nach dem Lauf zeigte die 44 %ige Sucroslösung des Cushions nur eine leicht rötliche Färbung. Diese Methode kann auch als empfindliches Instrument zur Prüfung der Seals oder anderer rotierender Teile des Rotors im Durchfluß auf deren Dichtigkeit benutzt werden.

Am Ende der Präparationen steht eine isopyknische Flotation und Sedimentation im Zonalrotor Ti-15. Die membranhaltige Bande des Flotationsgradienten hat eine Dichte entsprechend einer 42 %igen Sucroslösung und liegt in einem Volumen zwischen 40 und 100 ml als bräunlich gefärbte Suspension vor.

In den Spalten C5 und C7 der Tabelle I sind die Ergebnisse aus fünf Präparationen angeführt. Die höchsten Anreicherungen an 54Nu und AP liegen um 20-, aber üblicherweise zwischen 15- und 18-fach. Die bemerkenswerte Kontamination mit SDH - Anreicherungen zwischen 1,5 und 3-fach - erklärt möglicherweise die Sammlung der Membranen bei einer höheren Dichte als sonst mit $1,18 \text{ g/cm}^3$ angegeben. Die beste Konzentrierung der Membranen im Gradienten erhält man, wenn das in einer 48 %igen Sucroslösung homogenisierte Pellet der dritten Zentrifugation ca. 6 bis 8 Stunden lang bei 6 bis 10°C gerührt wird. Kürzere Rührzeiten ergeben meist breitere Banden oder geringere Ausbeuten. Der Grund hierfür liegt vermutlich in Differenzen des osmotischen bzw. onkotischen Druckes zwischen dem biologischen Material und der Sucroslösung, deren Ausgleich so lange beansprucht (36).

Ein Vergleich der Resultate der Flotation in den Zweigen B und C des Präparationsschemas zeigt eine Erhöhung der Kapazität von 150 auf 1000 Gramm Leberäquivalent. Dies ist zurückzuführen auf die Reduktion des Proteingehaltes bzw. anderer, nicht membranhaltiger Zellbestandteile in den vorhergehenden Durchflußzentrifugationen. Diese gleiche - also einem Kilogramm Leber entsprechende - Menge läßt sich auch in der der Flotation folgenden isopyknischen Sedimentation im Ti-15 Rotor aufarbeiten. Jetzt sammelt sich die die Membranen enthaltende Bande bei 40 % Sucrose im Gradienten. Wahrscheinlich läßt sich

die geringere Dichte auf die Eliminierung der Mitochondrien zurückführen, wie durch die Reduktion der SDH-Aktivität angezeigt wird (Tabellen I und III, Spalte C7).

Die besten Präparationen bringen eine Anreicherung der 5'-Nu und AP von 28- bis 30-fach, die Streuung reicht jedoch von den Faktoren 24 bis 30.

Die Übertragung dieser Methode auf die Gewinnung von Membranen aus anderen Organen, ja sogar schon aus den Lebern anderer Spezies, erfordert Modifikationen. Mittlerweile wurden in unserer Abteilung auch nach dem Prinzip der kombinierten Differential- und isopyknischen Zentrifugation, allerdings mit anderen Dichten der Sucroselösungen, distinkte Organellen aus Schweineleber isoliert (40). Hierbei blieb ebenfalls die Präparationskapazität von 1,5 Kilogramm Leber erhalten.

Damit ist erwiesen, daß sich prinzipiell die Möglichkeiten eines konkreten Einsatzes der kombinierten Differential- und isopyknischen Zentrifugation im Durchfluß aus Berechnungen analog den in Abbildung 8 dargestellten Diagrammen abschätzen lassen, falls die hydrodynamischen Parameter der interessierenden Partikel bekannt sind. Rotoren, die bei erheblich höheren Drehzahlen als die hier benutzten unter Bedingungen der Durchflußzentrifugation mit Sucroslösungen arbeiten könnten, ermöglichten damit auch Präparationen großer Mengen von Partikeln mit geringerer Sedimentationsgeschwindigkeit.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Mitzutani, T., Mitzutani, A.:
Adsorption of Cationic Biological Materials
on Controlled Pore Glass.
Analyt. Biochem. 83, 216-221 (1977)
- 2) Kalish, D.I., Cohen, C.M., Jacobson, B.S., Branton, D.:
Membrane Isolation on Polylysine-Coated Glas Beads
Asymmetrie of Bound Membrane.
Biochim. Biophys. Acta, 506 (1978) 97-110
- 3) Cohen, C.M., Branton, D.:
Asymetric Iodination of Plasma Membranes on
Polylysine Coated Beads.
J. Cell Biol. 75, 216a (1977)
- 4) Heidrich, H.G., Leutner, G.:
Two Types of Vesicles from the Erythrocytes Ghost
Membranes Differing in Surface Charge: Separation
und Charakterisation by Preparative Free-Flow
Electrophoresis.
Eur. J. Biochem. 41, 37 (1974)
- 5) Brunette, D.M., Till, J.E.:
A Rapid Method for the Isolation of L-Cell Surface
Membranes Using an Aqueous Two-Phase Polymer System.
J. Membr. Biol. 5, 215-224 (1971)
- 6) Albertsson, P.A. :
Partition of Cell Particels and Makromolecules in
Polymer Two-Phase Systems.
Adv. Prot. Chem. (ed. by Anfinsen, C.D., Edsall, J.T.,
Richards, F.M.) Vol. 24, 309-341, Acad. Press. N.Y.

- 7) Neville,D.M.,Jr., Kahn,R. :
Isolation of Plasma Membranes for Cell Surface
Receptor Studies.
Methods in Molekular Biologie (ed. by Laskin,A.I.,
Last,J.A.) Vol.5, 57-85, Marcel Dekker Inc., N.Y.
- 8) Wallach,H.D.F., Lin,P.S. :
A Critical Evaluation of Plasma Membrane Fractionation.
Biochim. Biophys. Acta, 300 (1973) 211-254
- 9) Emmelot,P., Bos,C.J., van Hoeven,R.P.,
van Blitterswijk,W.J. :
Isolation of Plasma Membranes from Rat and Mouse
Livers and Hepatomas.
Methods in Enzymologie (ed. by Fleischer,S.,
Packer,L.) Vol XXXI, 75-90 (1974)
- 10) Neville,D.M., Jr. :
The Preparation of Cell Surface Membrane Enriched
Fraktions.
Biochem. Analysis of Membranes (ed by Maddy,A.H.).
27-54, John Wiley & Sons, Inc., N.Y. (1976)
- 11) Hinton,R.H. :
Purification of Plasma-Membrane Fragments.
Subcellular Components, Preparation and Fractionation
(ed. by Birnie,G.D.), 119-156, Butterworths London
(1972)
- 12) Hinton,R.H., Dobrota,M., Fitzsimons,J.T.R., Reid,E. :
Preparation of a Plasma Membrane Fraction from Rat
Liver by Zonal Zentrifugation.
Eur. J. Biochem. 12 (1970) 349-361

- 13) Smigel, M., Frölich, J.C., Fleischer, S. :
Charakterisation of Prostaglandin E Receptor in
Membranes and its Use in The Assay of Prostaglandin.
Methods in Enzymologie (ed. by Fleischer, S., Packer, L.)
Vol. XXXI, 109-121, Acad Press. N.Y. (1974)
- 14) Neville, D.M., Jr. :
The Isolation of a Cell Membrane Fraction from
Rat Liver.
J. Biophys. Biochim. Cytol. 8, 413-422 (1960)
- 15) Touster, O., Aronson, N.N., Jr., Dulaney, J.T.,
Hendrickson, H. :
Isolation of Rat Liver Plasma Membranes.
J. Cell Biol. 47, 604-618 (1970)
- 16) Wisher, M.H., Evans, W.H. :
Funktionale Polarität of the Rat Hepatocyte Surface
Membrane.
Biochem. J. (1975) 146, 375-388
- 17) Wisher, M.H., Evans, W.H. :
Preparation of Plasma-Membrane Subfractions from
Isolated Rat Hepatocytes.
Biochem. J. (1977) 164, 415-422
- 18) Evans, H.W. :
Resolving biochemically the hepatocyte's multi-
funktionale pericelluläre Membran.
TIBS 2, 169-171 (1977)
- 19) Hinton, R., Dobrota, M. :
Density Gradient Centrifugation.
Laborat. Techn. in Biochem. and Molek. Biol.
(ed. by Work, T.S., Work, E.), 120-196, North-Holland
Publishing Comp. Amsterdam (1976)

- 20) Graham, J.M. :
Fractionations in Zonal Rotors.
Centrifugal Separations in Molec and Cell Biol.
(ed. by Birnie, G.D., Rickwood, D.), 63-114,
Butterworths London (1978)
- 21) Chevrenka, C.H., Elrod, L.H. :
A Manual of Methods for Large Scale Zonal Zentri-
fugation.
Beckmann-Spinco, Palo Alto, California, 25-34 (1972)
- 22) Anderson, N.G. :
An Introduction to Partikel Separations in Zonal
Zentrifuges.
National Cancer Institute Monograph 21, 9-39 (1966)
- 23) Lutz, F., Frimmer, M. :
A New Method for the Isolation of Plasma Membranes
from Pig Liver.
Hoppe-Seylers's Z. Physiol. Chem. Bd 351, 1429-1434
(1970)
- 24) Fleischer, B., Fleischer, S. :
Glycosidase Activity of Bovine Liver Plasma Membranes.
Biochem. Biophys. Acta, 183 (1969) 265-275
- 25) Fleischer, B., Fleischer, S., Ozawa, H. :
Isolation and Charakterization of Golgi Membranes
from Bovine Liver.
J. Cell Biol., Vol. 43, 59-69 (1969)
- 26) Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. :
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

- 27) Fiske, C.H., Subba Row, Y. :
The Colorimetric Determination of Phosphorus.
J. Biol. Chem. 66 (2), 375-400 (1925)
- 28) Hausamen, T.U., Helger, R., Rick, W., Gross, W. :
Optimal Conditions for The Determinations of
Serum Alkaline Phosphatase by a New Kinetic
Method.
Clin. Chim. Acta, 15 (1967) 241-245
- 29) Baginski, E.S., Foa, P.P., Zak, B. :
Glucose - 6 - Phosphatase.
Methoden der enzymatischen Analyse (ed. by
Bergmeyer, H.U.) Bd. I, 839-843 Verlag Chemie,
Weinheim (1970)
- 30) Pennington, R.J. :
Biochemistry of Dystrophic Muscle.
Biochemical J. 80, 649-654 (1961)
- 31) Fleischer, S., Kervina, M. :
Long-Term Preservation of Liver for Subcellular
Fractionation.
Methods in Enzymology, Vol. XXXI - Biomembranes -
(ed. by Fleischer, S., Packer, L.), 3-6, Acad. Press,
N.Y. (1974)
- 32) Franke, W.W., Deumling, B., Ermen, B., Jarasch, H.-D.,
Kleinig, H. :
Nuclear Membranes from Mammalian Liver, Isolation
Procedure and General Characterisation.
J. Cell Biol. Vol. 46, 379-395 (1970)

- 33) Evans, W.H. :
Fractionation of Liver Plasma Membranes Prepared
by Zonal Centrifugation.
Biochem. J. (1970) 166, 833-842
- 34) Anderson, N.G. :
Zonal Centrifuges and Other Separation Systems.
Science (Wash.) 154, 103-112 (1966)
- 35) Anderson, N.G., Harris, W.W., Barber, A.A., Rankin, C.T., Jr.,
Candler, E.L. :
Separation of Subcellular Components and Viruses
by Combined Rate- and Isopyknic-Zonal Centrifugation.
Nat. Cancer Inst. Monograph No. 21, 253 (1966)
- 36) Steck, T.L., Straus, J.H., Wallach, F.H. :
A Model For The Behavior of Vesicles in Density
Gradients: Implications for Fractionation.
Biochim. Biophys. Acta, 203 (1970) 385-393
- 37) Steck, T.L., Wallach, D.F.H. :
The Isolation of Plasma Membranes.
Methods in Cancer Research (ed. by Busch, H.),
93, Acad. Press. N.Y. (1970)
- 38) Emmelot, P., Bos, C.J., Benedetti, E.L., Rümke, Ph. :
Studies on Plasma Membranes: Chemical Composition
and Enzym Content of Plasma Membranes Isolated
from Rat Liver.
Biochim. Biophys. Acta, 90 (1964) 126-145
- 39) Graham, J.M., Higgins, J.A., Green, C. :
The Isolation of Rat Liver Plasma Membrane Fragments.
Biochim. Biophys. Acta, 150 (1968) 303-305

40) Bubenzer, H.J., Junger, E., Kühn, L. :

Large-Scale Preparation of Plasma Membranes
from Pig Liver: Morphologie, Encymic Pattern and
Binding of ^{125}I -Insulin to its Receptor.

Hoppe Seylers's Z. Physiol. Chem. 359, 1065 (1978)

Tabelle I:

Schwankungsbereich des Proteingehaltes und der Enzymaktivitäten auf den einzelnen Stufen der Präparationen.

Fraktion	Rohhomogenat 1.Sediment 2.Uberstand 2.Sediment 3.Sediment					Flotation T ₁ 15	Sedimentation T ₁ 15
Bezeichnung im Flußdiagramm	(A5)	(A8)	(C3)	(C4)	(C5)	(C7)	
protein	120 → 220mg/g	15 → 18%	14 → 16%	1 → 3%	3 → 5%	.8 → 1.5%	.5 → .8%
5'-Nucleotidase	3 → 13 U/g	38 → 48%	30 → 42%	5%	20 → 25%	16 → 20%	12 → 17%
Alkalische Phosphatase	5 → 15 U/g	36 → 45%	30 → 40%	5%	22 → 28%	15 → 18%	11 → 15%
Phosphodi- esterase	3 → 11 U/g	22 → 30%	22 → 28%	1%	9 → 14%	5 → 8%	5 → 8%
Succinatdehydro- genase	3.5 → 4.5 U/g	35 → 40%	30 → 35%	5%	8 → 10%	2 → 4%	.3%
Glucose -6- phosphatase	22 → 28 U/g	16 → 22%	16 → 18%	1%	2 → 2.5%	.5%	.1%

Den Werten des Rohhomogenates liegen 31 Präparationen zugrunde. Sie sind auf ein Gramm Frischgewicht Leber bezogen. Die Ergebnisse der Präparationsstufen A8 bis C7 sind in Prozentgehalt des Rohhomogenates angegeben. Sie basieren auf der Analytik aus fünf Präparationen.

Tabelle II: Berechnung der Variationskoeffizienten
(nähere Erläuterungen siehe Text)

	$\bar{X}$	$\frac{S}{\bar{X}}$	$\frac{1}{n} \sum \frac{S}{\bar{X}_1}$
Protein	165 mg/g	0,32	0,112
Alkalische Phosphatase	9,63 U/g	0,33	0,096
5'-Nucelotidase	7,33 U/g	0,39	0,089
Phosphodiesterase	10,8 U/g	0,26	0,11
Succinatdehydrogenase	3,36 U/g	0,34	0,12
Glucose -6-Phosphatase	27,5 U/g	0,2	0,04

$\bar{X}$ - Mittelwert aus 31 Präparationen

$\frac{S}{\bar{X}}$ - Variationskoeffizient der unter $\bar{X}$ angegebenen Mittelwerte

Spalte 3: n=8, Anzahl der Lebern, aus denen 31 Präparationen erfolgten. Aus einer Leber konnten zwischen drei und fünf Präparationen durchgeführt werden.

$\bar{X}_1$ stellt hier den Mittelwert der Präparationen aus einer Leber dar, so daß in dieser Spalte die Mittelwerte der Variationskoeffizienten der Präparationen aus einer Leber aufgeführt sind.

Der Variationskoeffizient aus allen Präparationen ist etwa dreimal so groß wie der Mittelwert der Variationskoeffizienten, der aus den Präparationen aus einer Leber berechnet wurde.

Tabelle III:

Absolutwerte der Proteilmenge und Enzymaktivitäten sowie die prozentuale Ausbeute und relative Aktivität, bezogen auf die jeweilige Proteinmenge aus einem Präparationsgang.

Fraktion	Rohhomogenat 1.Sediment 2.Überstand 2.Sediment 3.Sediment							Flotation Ti 15	Sedimentation Ti 15
	(A5)	(A8)	(C3)		(C4)	(C5)	(C7)		
Protein	180 mg/g	32 mg/g 18%	29 mg/g 16%	1.5 mg/g .8%	7 mg/g 3.9%	2.3 mg/g 1.2%	1.2 mg/g .6 % 1.2 g/kg		
5'-Nucleotidase	9 U/g	4.2 U/g 46% 2.5 f	3.6 U/g 40% 2.5 f	.4 U/g 4.4% 5 f	2.2 U/g 24% 6.2 f	1.7 U/g 18% 15 f	1.5 U/g 16% 25 f		
Alkalische phosphatase	11 U/g	4.6 U/g 42% 2.3 f	4.4 U/g 40% 2.5 f	.1 U/g 1.1% 1 f	2.9 U/g 26% 6.7 f	1.9 U/g 17% 14 f	1.6 U/g 14.5% 24 f		
Phosphodi- esterase	6 U/g	1.7 U/g 28% 1.5 f	1.65 U/g 27% 1.6 f	0	.75 U/g 12% 3.2 f	.45 U/g 7.5% 6 f	.38 U/g 6.3% 9.5 f		
Succinatde- hydrogenase	3.6 U/g	1.4 U/g 39% 2 f	1.2 U/g 33% 2 f	.15 U/g 4% 5 f	.32 U/g 8.8% 2.3 f	.09 U/g 2.5% 2.5 f	.011 U/g .3% .4 f		
Glucose -6- phosphatase	26 U/g	4.9 U/g 19% 1 f	4.7 U/g 18% 1 f	0	.6 U/g 2.3% .6 f	.11 U/g .42% .35 f	.02 U/g .08% .1 f		

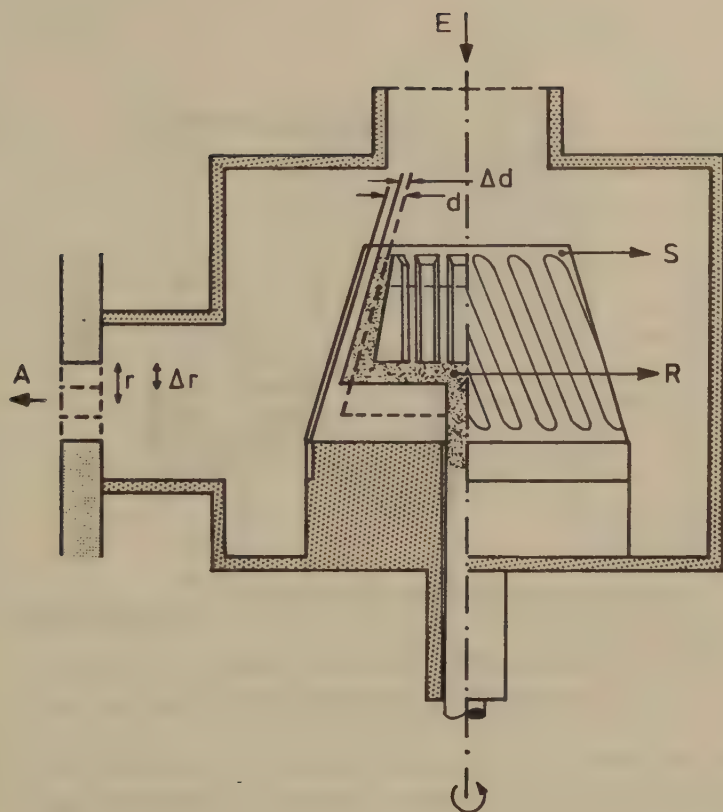


Abbildung 1:

Querschnitt durch den Durchflußhomogenisator

In die Einlaßöffnung E wird mit Hilfe eines fest montierten Trichters die Suspension eingefüllt.

Die Spaltbreite d zwischen Rotor R und Stator S wird durch Höhenverstellung des Rotors verändert.

Der Durchmesser der Ausflußöffnung A wird durch Vor-
satz von Schläuchen mit verschiedenen Radien r variiert.

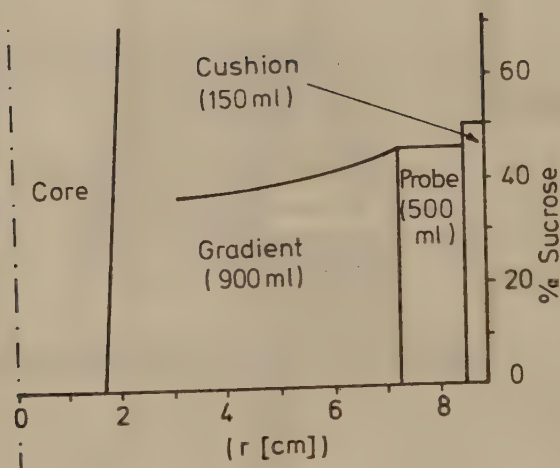


Abbildung 2:

Querschnitt durch den zur Flotation vorbereiteten Ti-15 Zonalrotor (Beckmann)

Die Konzentration der Sucroslösungen (Ordinate) ist dargestellt als Funktion des jeweiligen Abstandes r von der Rotormitte (Abzisse).

Im Raum zwischen Core und Gradient befindet sich kein overlay, sondern Luft.

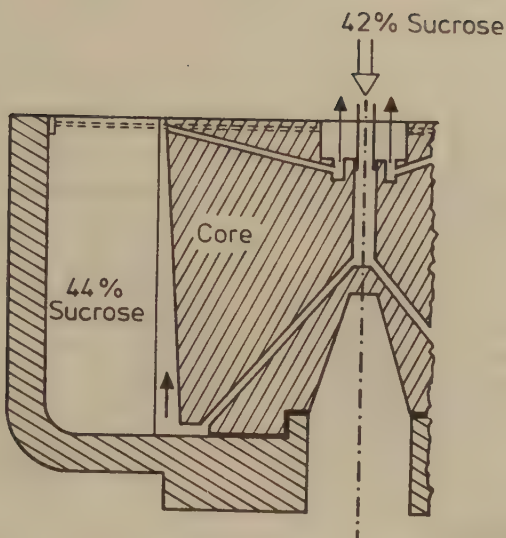


Abbildung 3:

Schnitt durch den JCF-Rotor mit high-capacity-core vor der zweiten Durchflußzentrifugation.

Das Homogenat (42 % Sucroselösung) wird zentral eingepumpt, strömt am Cushion (44 %ige Sucrose) vorbei und tritt peripher aus.

Das Volumen des durchströmten Raumes beträgt ca. 120 ml.

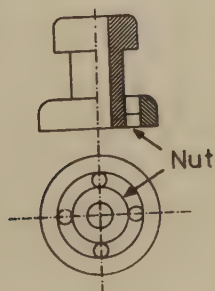


Abbildung 4:

Verändertes Seal mit eingefräster Nut.

Auslaß- öffnung	Auslaß- fläche (cm ²)	Fließrate (l/min)	Kernzahl (n/g-Leber)
A	3,35	2,73	$5,8 \times 10^7$
B	1,9	1,22	$2,8 \times 10^7$
A/B	1,76	2,25	2,07

Abbildung 5:

Die Kernzahl im Homogenat als Funktion der Stellung A oder B der Ausflußöffnung des Durchflußhomogenisators. In der letzten Zeile sind die Quotienten aus den Werten gebildet, die den Stellungen A und B zuzuordnen sind.

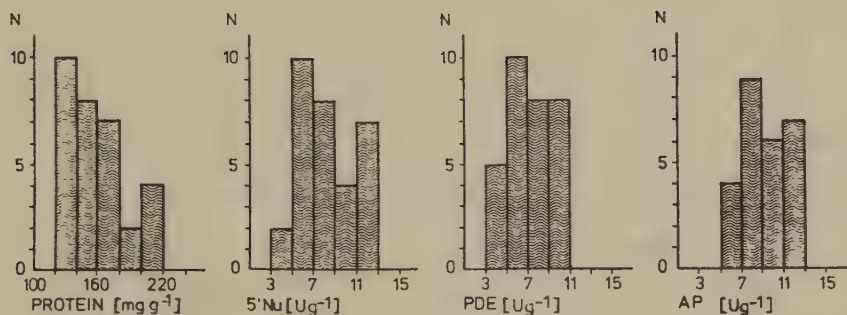


Abbildung 6:

Häufigkeitsverteilung der getesteten Leitenzyme der Plasmamembranen 5'-Nucleotidase (5'Nu), Phosphodiesterase (PDE) und alkalische Phosphatase (AP) sowie des Proteingehaltes im Rohhomogenat an den jeweiligen Präparationen. Weitere Erklärungen s. Text.

N = Zahl der Präparationen.

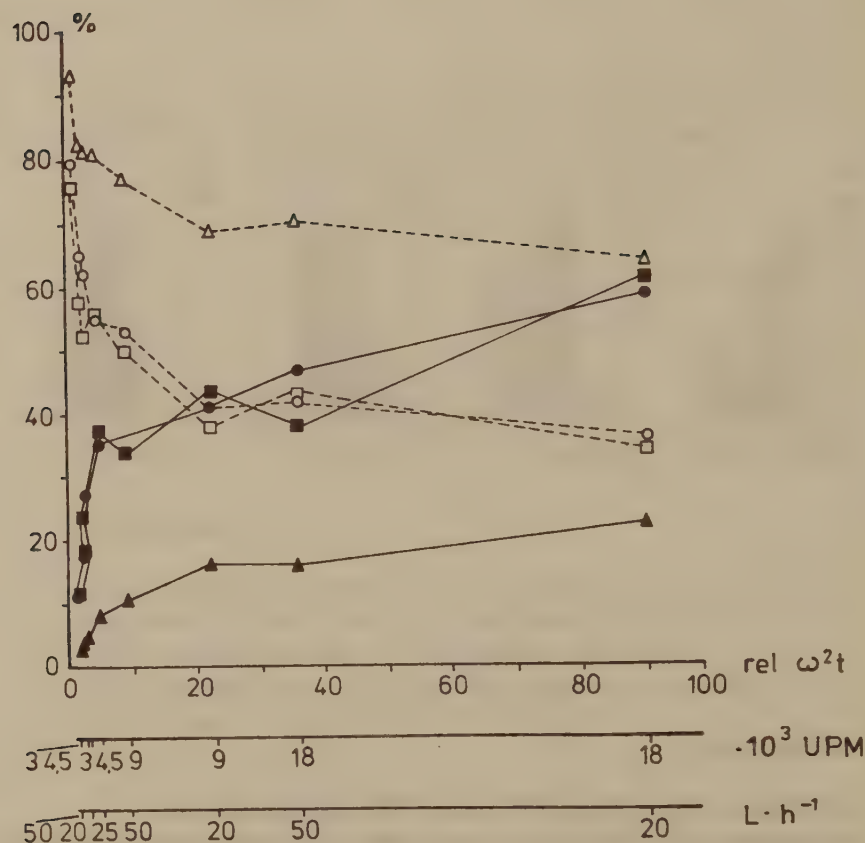


Abbildung 7:

Gehalte an Protein (Δ), 5'-Nucleotidase ($\square$) und alkalische Phosphatase ($\circ$) im Überstand und im Sediment ($\blacktriangle$, $\blacksquare$, $\blacktriangle$) in Abhängigkeit von der Umdrehungs- (UPM) und Durchflußgeschwindigkeit [$\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$], bzw. dem kombinierten Maß als relative $\omega^2 \cdot t$.

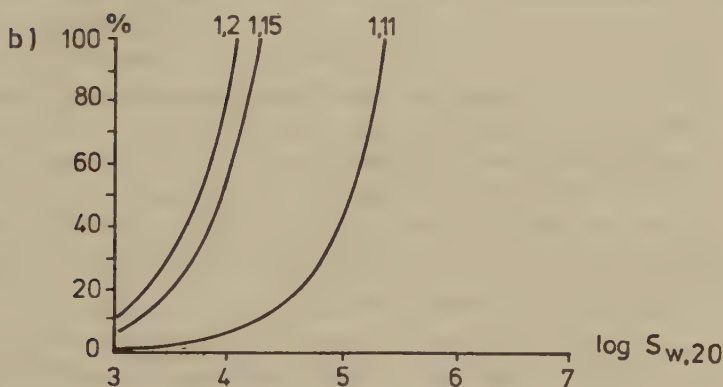
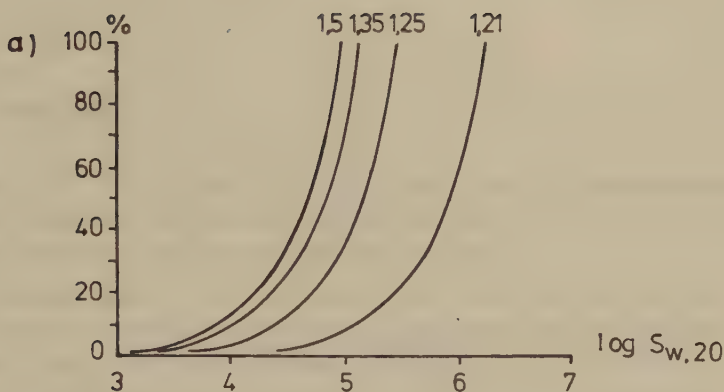


Abbildung 8:

Berechnung der Menge im Sediment in Abhängigkeit von $S_{w,20}$ -Werten mit Partikeldichten (g/cm^3) als Parameter unter den Bedingungen der zweiten (a) und der dritten (b) Durchflußzentrifugation.

Den äußerst rechten Kurven ist jeweils eine Dichte zugeordnet, die knapp über der des Cushions liegt.

Lebenslauf:

Am 21.01.1943 wurde ich als drittes Kind des Bäckermeisters Ferdinand Budde und seiner Ehefrau Martha Budde, geborene Bedenbecker, in Münster (Westf) geboren.

Nach dem Besuch der St. Martini Volksschule in Münster (1949 - 1953) wechselte ich zur Städtischen Realschule für Jungen in Münster über (1953 - 1957).

Im Anschluß daran begann ich eine dreijährige Konditorlehre (1957 - 1960), die ich mit der bestandenen Gehilfenprüfung beendete.

Vom 01.04.1960 - 31.03.1961 arbeitete ich als Konditorgehilfe in der Konditorei Wolff in Essen.

Es folgte eine zweijährige Bäckerlehre im elterlichen Betrieb, die ich mit der bestandenen Gesellenprüfung als Bäcker abschloß (01.04.1961 - 31.03.1963).

Die folgenden drei Jahre arbeitete ich dann als Bäckergehilfe im elterlichen Betrieb (01.04.1963 - 03.01.1966).

Ich besuchte die "Erste Deutsche Bäckerfachschule e.V." in Olpe (Westf) mit Ablegung der Meisterprüfung im Bäckerhandwerk vor dem Meisterprüfungsausschuß der Handwerkskammer Arnsberg am 04.04.1966.

Ich arbeitete als verantwortlicher Meister im elterlichen Betrieb vom 05.04.1966 bis 16.09.1967.

Am 28.12.1966 starb mein Vater nach einjähriger Krankheit.

Da ich beabsichtigte, das Abitur nachzuholen, schlossen wir das elterliche Geschäft zum 16.09.1967.

Nach dem Besuch des Clemens-Hofbauer-Kollegs "Altsprachliches Institut zur Erlangung der Hochschulreife" in Bad Driburg vom 04.11.1967 - 05.06.1972 legte ich am 05.06.1972 mein Abitur ab.

Ich begann das Studium der Zahnmedizin im Wintersemester 1972/73 an der Universität Düsseldorf. Die zahnärztliche

Vorprüfung (naturwissenschaftlicher Teil) bestand ich am 29.01.1974; die zahnärztliche Vorprüfung am 07.03.1975. Das zahnärztliche Staatsexamen legte ich am 04.11.1977 an der Universität Düsseldorf ab.

Die Approbation als Zahnarzt wurde mir am 02.12.1977 erteilt.

Am 01.01.1978 trat ich die zweijährige Assistentenzeit in einer Kassenzahnarztpraxis in 4405 Nottuln 3, an bis zu meiner Herzoperation (Aortenklappenersatz und doppelter coronarer Bypass) am 06.12.1979. Seit dieser Zeit befinde ich mich in stationärer Behandlung.

Seit dem 03.06.1978 bin ich mit Rita, geborene Hammecke, verheiratet.

Lebenslauf:

Am 16. Juli 1950 wurde ich, Hermann Gundlach, als drittes von drei Kindern des Zahnarztes Werner Gundlach und seiner Frau Hanna, geborene Lühr, in Lüneburg geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule I in Lüneburg, und von 1961 bis 1969 das dortige Gymnasium Herderschule. Im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig legte ich 1969 die Reifeprüfung ab.

Von 1970 bis 1972 arbeitete ich als Praktikant in einem zahntechnischen Labor in der Nähe von Lüneburg.

Im Wintersemester 1972 begann ich das Zahnmedizin-studium an der Universität Düsseldorf. Die natur-wissenschaftliche Vorprüfung bestand ich im August 1973, die zahnärztliche Vorprüfung (Physikum) im März 1975. Im Sommersemester 1977 und zu Beginn des Wintersemesters 1977 legte ich die zahnärztliche Prüfung ab. Die Approbation zum Zahnarzt erfolgte am 08. Dezember 1977.

Danach ging ich zum 01. Januar 1978 als Ausbildungs-assistent in die Praxis meines Vaters. Vom April 1978 bis zum Juni 1979 leistete ich den Grundwehrdienst als Stabsarzt bei der Bundesmarine ab. Seit Oktober 1979 bin ich für etwa ein Jahr wieder als Ausbil-dungsassistent in einer zahnärztlichen Praxis in der Nähe von Augsburg tätig.

Ich beabsichtige, mich 1981 in Lüneburg als Zahnarzt niederzulassen.

Seit August 1979 bin ich mit Susanne, geborene Fischer, verheiratet.

